

**Family list**

**6** family members for:

**WO0300**

Derived from 3 applications.

- 1 POLYNUCLEOTIDE VACCINE POLYNUCLEOTIDE VACCINE**  
Publication info: **CA2460809 A1** - 2003-01-03
- 2 POLYNUCLEOTIDE VACCINE**  
Publication info: **EP1428879 A1** - 2004-06-16
- 3 Vaccine comprising polynucleotides**  
Publication info: **US2004198684 A1** - 2004-10-07
- 4 POLYNUCLEOTIDE VACCINE**  
Publication info: **WO03000894 A1** - 2003-01-03  
**WO03000894 A9** - 2003-02-27
- 5 VACCINE COMPRISING POLYNUCLEOTIDE**  
Publication info: **WO2004058299 A1** - 2004-07-15

---

Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2003 年 1 月 3 日 (03.01.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 03/000894 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12N 15/12, 15/11, (72) 発明者; および  
A61K 38/02, 39/00, 48/00 (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 珠玖 洋  
(SHIKU, Hiroshi) [JP/JP]; 〒514-0061 三重県 津市 一  
(21) 国際出願番号: PCT/JP02/05486 身田上津部田 1 5 4 7-3 2 Mie (JP).
- (22) 国際出願日: 2002 年 6 月 4 日 (04.06.2002) (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
(25) 国際出願の言語: 日本語 BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
(26) 国際公開の言語: 日本語 DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
(30) 優先権データ: ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LI,  
特願2001-191334 2001 年 6 月 25 日 (25.06.2001) JP LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ,  
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): アンジェ OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,  
ス エム ジー 株式会社 (ANGES MG, INC.) [JP/JP]; 〒 TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.  
560-0082 大阪府 豊中市 新千里東町 1 丁目 四番 二 号  
Osaka (JP). (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,  
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許  
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特  
許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,

[続葉有]

(54) Title: POLYNUCLEOTIDE VACCINE

(54) 発明の名称: ポリヌクレオチドワクチン

(57) Abstract: A DNA vaccine for expressing tumor-specific immunity. More specifically, a DNA vaccine which contains expres-  
sion vectors encoding an antigen recognized by CD4<sup>+</sup> helper T cells and another antigen recognized by CD8<sup>+</sup>CTL. It is preferable  
that the antigen recognized by CD4 is a molecule identified by the SEREX method while the antigen recognized by CD8<sup>+</sup>CTL is a  
tumor antigen. It is preferable that the above expression vectors are immobilized on a single gold grain and administered into cells  
by a gene gun so that the antigens recognized by CD4<sup>+</sup> helper T cells and CD8<sup>+</sup>CTL can be expressed and presented in a single cell,  
though the invention is not restricted thereto. It is also usable as a drug.

(57) 要約:

本発明は、腫瘍特異免疫を発現させるための DNA ワクチンに関する。より詳細  
には、CD4<sup>+</sup>ヘルパーT細胞により認識される抗原、及び、CD8<sup>+</sup>CTLにより認識さ  
れる抗原をコードする発現ベクターを含む DNA ワクチンに関する。ここで CD4  
により認識される抗原は好ましくは、SEREX 法により同定された分子であり、CD8<sup>+</sup>  
CTLにより認識される抗原は好ましくは、腫瘍抗原である。また、これに限定さ  
れるわけではないが、CD4<sup>+</sup>ヘルパーT細胞及び CD8<sup>+</sup>CTLにより認識される抗原は  
好ましくは同一の細胞で発現され、提示されることを可能とするように、該発現  
ベクターは同一の金粒子上に固定され、遺伝子銃により細胞内へ投与されるもの  
である。する薬剤としても利用することができる。

WO 03/000894 A1

LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

## 明細書

## ポリヌクレオチドワクチン

技術分野

本発明は、生体内において腫瘍特異免疫を発現させるためのワクチンに関する。より詳細には、CD4<sup>+</sup>ヘルパーT細胞により認識される抗原、及び、CD8<sup>+</sup>細胞障害性T細胞(CTL)により認識される抗原をコードする発現ベクターを含むポリヌクレオチドワクチンに関する。ここでCD4<sup>+</sup>ヘルパーT細胞により認識される抗原は好ましくは、SEREX (serological identification of antigen by recombinant cDNA expression cloning) 法により見つけられた分子であり、CD8<sup>+</sup>CTLにより認識される抗原は好ましくは、腫瘍抗原である。また、これに限定されるわけではないが、CD4<sup>+</sup>ヘルパーT細胞及びCD8<sup>+</sup>CTLにより認識される抗原をコードする発現ベクターは、好ましくは同じ細胞で発現され、提示されることを可能とするように同一の担体粒子等の上に固定され、細胞内へ投与されるものである。

背景技術

ここ10余年来、日本における死亡原因では癌が第一位を占めており、手術、放射線及び化学療法と共に免疫療法も第4の治療法として期待されている。免疫療法は生体内の免疫応答のシステムを利用した治療法である。免疫応答の誘起と制御はBリンパ球、Tリンパ球、抗体、及び、抗原提示細胞(APC)の間の相互作用により行われる。まず、外来抗原はAPCによるプロセッシングを受け、主要組織適合複合体(MHC)クラスI及びクラスII分子に結合され、ヘルパーT細胞に提示される。ヘルパーT細胞によりMHCに結合した外来抗原が認識されることにより、T細胞の活性化が起こり、サイトカインが分泌され、抗原で刺激されたB細胞が抗体産生細胞へと分化するのを助けると共に、キラーT細胞の分化も促す。

分泌された抗体及び活性化されたキラーT細胞により抗原を提示する細胞が排除され、外来抗原を排除する細胞性・体液性の反応が進行する。

抗原を発現する細胞のT細胞による排除は主に、1) 体液性免疫(活性化ヘルパーT細胞により特異的B細胞クローンの増殖・分化が刺激され抗体が産生され、抗体が抗原の認識と排除に働く)、2) 特異的細胞性免疫(活性化ヘルパーT細胞により抗原特異的に反応する細胞障害性T細胞(CTL)が誘導され、直接標的に作用する)、及び、3) 非特異的細胞性免疫(活性化ヘルパーT細胞により非特異的なナチュラルキラー細胞や活性化マクロファージ等が誘導されて働く)に分類することができる。以上のようにT細胞が中心的な役割を果たして、標的となる抗原を認識し免疫応答が動員される。

腫瘍拒絶においても、先天性及び自己由来の腫瘍細胞、または、その断片誘導体を用いた適当な免疫化により宿主細胞において抗腫瘍免疫応答が誘導されることが古くから知られている(L.Gross, Cancer Res. 3: 326-333 (1943); E.J.Foley, Cancer Res. 13: 835-837 (1953); R.T.Prehn and J.M.Malin, J.Natl.Cancer Inst. 18: 769-778 (1957); G.Klein et al., Cancer Res. 20: 1561-1572 (1980年); L.Old et al., Ann.N.Y.Acad.Sci. 101: 80-106(1962); A.Globerson and M.Feldman, J.Natl.Cancer Inst. 32: 1229-1243(1964))。このような抗腫瘍免疫システムにおけるCD8<sup>+</sup>及びCD4<sup>+</sup>T細胞の役割が注目されている(R.J.North, Adv.Immunol 35: 89-155 (1984); P.D.Greenberg, Adv.Immunol. 49: 281-355 (1991); D.M.Pardoll and S.L.Topalian, Curr.Opin.Immunol. 10: 588-594 (1998))。特異的に免疫化されたマウス由来のCD8<sup>+</sup>T細胞は *in vitro*において腫瘍標的細胞を破壊することができ(H.Wagner et al., Adv.Cancer Res. 31: 77-124 (1980))、免疫化されたドナーからのCD8<sup>+</sup>T細胞の受身的な転移(adoptive transfer)は感受性マウスに腫瘍移植に対する抵抗性を与える(R.J.North, Adv.Immunol 35: 89-155 (1984); P.D.Greenberg, Adv.Immunol. 49: 281-355 (1991); C.J.M.Melief, Adv.Cancer Res. 58: 143-175 (1992))ことが報告されて

いる。さらに、抗 CD8<sup>+</sup>抗体は予め免疫化されたマウスの腫瘍移植に対する抵抗性を消失させる (E.Nakayama and A.Uenaka, J.Exp.Med. 161: 345-355 (1985); X.G.Gu et al., Cancer Res., 58: 3385-3390 (1998); Y.Noguchi et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 92: 2219-2223 (1994)) ことも知られている。ここ十年で、マウス及びヒトの腫瘍細胞由来で CD8<sup>+</sup>T 細胞により認識される MHC クラス I 結合ペプチドが明らかにされてきた (T.Boon et al., Annu.Rev.Immunol. 12: 337-368 (1994); S.A.Rosenberg, Immunity 10: 281-287 (1999))。

腫瘍抗原、即ち腫瘍細胞上の標的分子には、MHC クラス I 分子によって提示される腫瘍ペプチドで細胞性免疫の主役である CD8<sup>+</sup>CTL の標的である分子 (腫瘍拒絶抗原)、及び、腫瘍細胞膜に発現する腫瘍関連抗原と呼ばれる体液性免疫 (抗体) の標的となる分子の 2 つの形態が存在する。T リンパ球に認識されるヒト腫瘍抗原が遺伝子レベルで明らかにされて以来、種々のヒト腫瘍拒絶抗原が見出されている。メラノーマにおいて、腫瘍拒絶抗原を用いた特異免疫療法としてのワクチン療法による明らかな抗腫瘍効果も認められている。更に、サイトカインを併用しての免疫療法効果の増強や、抗原ペプチドをパルスした樹状細胞、または、抗原遺伝子を導入した樹状細胞の応用も試みられており、最近では DNA ワクチンも試みられている。

また、CD4<sup>+</sup>T 細胞によるヘルパー作用を増大させる方法も多数、試みられている (D.Pardoll and S.L.Topalian, Curr.Opin.Immunol. 10: 588-594 (1998); R.F.Wang, Trends Immunol. 5: 269-276 (2001))。従来の方法は 3 つに分類することができる。1 つは、例えば抗原のハプテン化 (Y.Mizushima et al., J.Natl.Cancer Inst. 74: 1269-1273 (1985))、または、抗原に異種免疫原性ペプチドを直接連結させる方法 (R.W.Chesnut et al. (1995) Vaccine Design, eds. M.F.Powell and M.J.Newman (Plenum, New York) pp.847-874; J.Rice et al., J.Immunol. 167: 1558-1565 (2001)) 等の免疫抗原自体の修飾である。第 2 の方法は、腫瘍抗原と、腫瘍抗原をコードするウイルスベクター (M.Wang et

al., J. Immunol., 154: 4685-4692 (1995))等の強いヘルパー決定基を持つ分子との共免疫化による方法である (R. Romieu et al., J. Immunol. 161: 5133-5137 (1998); N. Casares et al., Eur. J. Immunol. 31: 1780-1789 (2001))。最後の方法は、CD40 リガンド (J. P. Ridge et al., Nature (London) 393: 474-478 (1998); S. R. M. Bennett et al., Nature (London) 393: 478-480 (1998); S. P. Schoenberg et al., Nature (London) 393: 480-483 (1998))、及び、CD4<sup>+</sup>T 細胞のヘルパー機能及び APC の CD4<sup>+</sup>T 細胞との相互反応を調節するその他の刺激性または共刺激性シグナル (A. Porgador et al., J. Exp. Med. 188: 1075-1082 (1998))等の分子シグナルにより、これらのシグナルの発見により CD8<sup>+</sup>T 細胞応答の増大させる方法が提供され则认为られている。

一方、抗体は従来、抗腫瘍エフェクター機能に関しては大した役割を有さないと考えられていたが、例えば、NY-ESO-1 等の腫瘍抗原 (Y.-T. Chen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 1914-1918 (1997); E. Jager et al., J. Exp. Med. 187: 625-630 (2000); E. Jager et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 12198-12203 (2000)) は、細胞性免疫及び体液性免疫の両方を含む強い完全な免疫応答を誘導する。腫瘍に対するワクチンとなり得る腫瘍関連抗原を同定する方法として、近年 M. Pfreundschuh ら (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 1914-1918 (1997)) により SEREX と呼ばれる方法が開発された。該方法は、ヒト血清を用いてヒト腫瘍の cDNA 発現ライブラリーの検索を行うものであり、インターネットには、SEREX 法により同定された遺伝子が SEREX データベースとして 1800 種を超えて登録されている ([www.licr.org/SEREX.html](http://www.licr.org/SEREX.html))。

しかし、同定された抗原ペプチドや DNA によりいかに効率良く腫瘍特異免疫を誘導し、腫瘍を完治させるためにどのようなアジュバントや APC を用いるべきか、腫瘍の免疫系からの逃避にどのように対処するかといった多数の問題についての解決は未だ為されていない。

ところで、CTL の定量的／定性的な増幅におけるヘルパー T 細胞の必要性が良

く報告されているが、それらにより認識される抗原分子の性質、及び、抗腫瘍免疫応答に対する機能的影響については未だにほとんど知られていない(P.D.Greenberg, *Adv.Immunol.* 49: 281-355 (1991); D.M.Pardoll and S.L.Topalian, *Curr.Opin.Immunol.* 10: 588-594 (1998); S.R.Bennett et al., *J.Exp.Med.* 186: 65-70 (1997); R.F.Wang *Trends Immunol.* 5: 269-276 (2001); C.Fayolle et al., *J.Immunol.* 147: 4069-4073 (1991); M.Shiral et al., *J.Immunol.* 152: 1549-1556 (1994); K.Hung et al., *J.Exp.Med.* 188: 2357-2368 (1998); F.Ossendorp et al., *J.Exp.Med.* 187: 693-702 (1998); Y.Shen and S.Fujimoto, *Cancer Res.* 56: 5005-5011 (1996); T.Nishimura et al., *J.Exp.Med.* 190: 617-627 (1999); D.R.Surman et al., *J.Immunol.* 164: 562-565 (2000); A.Franco et al., *Nat.Immunol.* 1: 145-150 (2000); C.N.Baxevanis et al., *J.Immunol.* 164: 3902-3912 (2000); F.Fallarino et al., *J.Immunol.* 165: 5495-5501 (2000); A.L.Marzo et al., *Cancer Res.* 59: 1071-3390 (1999); A.L.Marzo et al., *J.Immunol.* 165: 6047-6055 (2000))。最近提案されているヘルパーT細胞、CTL及びAPC間の連続的な細胞間相互作用では、抗腫瘍免疫応答に関係するヘルパーT細胞が、広い範囲にわたる多様な抗原を認識する可能性が示唆されている(J.P.Ridge et al., *Nature* 393: 474-478 (1998); S.R.M.Bennett et al., *Nature* 393: 478-480 (1998); S.P.Schoenberger et al., *Nature* 393: 480-483 (1998); Z.Lu et al., *J.Exp.Med.* 191: 541-550 (2000))。

上記において述べた SEREX 法によりヒト及びマウス腫瘍における体液性免疫応答の分析が大幅に進められている(Y.-T.Chen et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 94: 1914-1918 (1997); E.Jager et al., *J.Exp.Med.* 187: 625-630 (2000); E.Jager et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 97: 12198-12203 (2000); U.Sahin et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 92: 11810-11813 (1995); L.J.Old and Y.-T.Chen, *J.Exp.Med.* 187: 1163-1167 (1998); Y.-T.Chen, (2000) in "Principle and Practice of the Biologic Therapy of Cancer", ed. S.A.Rosenberg (Lippinc



ott Williams & Wilkins, Philadelphia) pp.557-570; T.Ono et al., Int.J.Cancer 88: 845-851 (2000))。SEREX 法により同定された遺伝子の多くが完全に配列決定した場合に野生型と同じ配列、即ちアミノ酸置換等を有さないことが報告されている (L.J.Old and Y.-T.Chen, J.Exp.Med. 187: 1163-1167 (1998); Y.-T.Chen, (2000) in "Principle and Practice of the Biologic Therapy of Cancer", ed. S.A.Rosenberg (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia) pp.557-570)。従って、これらの分子は変異により免疫原性を示すものではなく、また幾つかの SEREX 抗原は普通の組織において腫瘍における限定的な発現 (例えば、癌/精巣抗原及びメラニン細胞分化抗原等) を示すが、ほとんどの SEREX 同定抗原は普遍的に発現されている。しかしながら、これらの野生型分子に対して高い力価を有する抗体が関連または非関連癌患者の血清試料中で、健常者と比べてより多く見ついている。現在のところ、これらの腫瘍産物の増幅された発現が体液性免疫を誘起する免疫原刺激であるとされている。これらの分子の全てが IgG クラスの抗体により検出されるので、これらの野生型分子の CD4<sup>+</sup>ヘルパーT 細胞による認識が考えられる。上記知見を勘案し、発明者らは腫瘍細胞の免疫原性野生型分子が CD4<sup>+</sup>ヘルパーT 細胞を活性化することにより腫瘍特異的 CD8<sup>+</sup>CTL を増幅させることができるか、即ち抗腫瘍免疫応答に関与するかどうかを本発明において調べた。

DNA ワクチンに関しては、naked DNA の筋肉内投与により体液性及び細胞性免疫応答の両方が誘発されることが証明されている。DNA ワクチンが免疫応答を誘発する正確な機構は現在のところ不明であるが (Pardoll et al., Immunity 3: 165-169 (1995)参照)、その有効性は、体液性及び細胞性免疫の誘発により示される。この結果は、DNA ワクチンの投与後に naked DNA が発現され、そのペプチド産物が MHC クラス I 及びクラス II 蛋白質と共に抗原として提示されることを示す。

CTL 上の T 細胞レセプターが MHC クラス I 及び/またはクラス II 分子と結合

したウイルスまたは細菌等の由来の外来ペプチドを抗原として認識することにより、各種リンホカイン産生及び細胞増殖等の反応を促し、ペプチドが由来するウイルスまたは細菌等に感染した細胞を殺すことが知られている。これらの抗原ペプチドは、その病原体中での存在場所や機能に関係なく APC または他の細胞が細胞内に取込み、処理した断片である。人工的に CTL 応答を生じさせるためには、細胞内で蛋白質抗原を産生させる複製ベクターを用いる (J.R.Bennink and J.W.Yewdell, *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 163: 153 (1990); C.K.Stover et al., *Nature* 351: 456 (1991); A.Aldovini and R.A.Young, *Nature* 351: 479 (1991); R.Schfer et al., *J.Immunol.* 149: 53 (1992); C.S.Hahn et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 89: 2679 (1992)) か、または、細胞質ゾル中にペプチドを導入する方法 (F.R.Carbone and M.J.Bevan, *J.Exp.Med.* 169: 603 (1989); K.Deres et al., *Nature* 342: 561 (1989); H.Takahasi et al., *Nature* 344: 873 (1990); D.S.Collins et al., *J.Immunol.* 148: 3336 (1992); M.J.Newman et al., *J.Immunol.* 148: 2357 (1992)) が知られている。

また、naked ポリヌクレオチドをワクチンとして脊椎動物に摂取する方法が検討されている (WO90/11092(1990 年 10 月 4 日))。マウス腹腔内、静脈内または筋肉内に投与された塩化カルシウム沈殿 DNA が発現され得ることが公知である (N.Benvenisty and L.Reshef, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 83: 9551-9555 (1986))。マウスにおいて、DNA 発現ベクターを筋肉内注射することにより筋肉細胞に該ベクターが取込まれ、細胞内で該ベクターの発現が起こることが示された (J.A.Wolff et al., *Science* 247: 1465 (1990); G.Ascadi et al., *Nature* 352: 815 (1991))。この場合、該ベクターはエピソームとして維持され、複製はされなかった。ラット、魚及び霊長類の骨格筋、並びに、ラット心筋への注射後には永続性の発現が観察された (H.Lin et al., *Circulation* 82: 2217 (1990); R.N.Kitsis et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 88: 4138 (1991); E.Hansen et al., *FEBS Lett.* 290: 73 (1991); S.Jiao et al., *Hum.Gene Therapy* 3: 21 (1

992); J.A.Wolff et al., Human Mol.Genet. 1: 363 (1992))。また、APC 表面の B7 及び MHC のエピトープの提示が、腫瘍除去の際の CTL 活性化において同程度の役割を果たすことが報告されている (Edington, Biotechnology 11: 1117-1119 (1993))。この際に、APC 表面の MHC 分子が T 細胞レセプターにエピトープの提示を行うと、同じ APC 表面上に発現されている B7 が CTLA-4 または CD28 に結合し、第 2 のシグナルとして作用する。その結果、APC を壊す CD8<sup>+</sup>T 細胞を増殖させるシグナルを発する CD4<sup>+</sup>ヘルパー-T 細胞が急速に分裂する。

DNA による免疫化のためには、DNA の筋肉内投与の形態を必ずしも取る必要はなく、例えば、ウシ成長ホルモン(BGH)をコードする DNA で被覆した金粒子をマウスの皮膚に投与することによりマウスで抗 BGH 抗体が産生されることが Tang らにより示された(Nature 356: 152-154 (1992))。また、皮膚以外にもジェット注射器を使用して生きている動物の筋肉組織、脂肪組織及び乳腺組織等をトランスフェクトすることができることが報告されている (Furth et al., Analytical Biochemistry 205: 365-368 (1992))。核酸を生体内へ導入し得る種々の方法が総説 (T.Friedman, Science 244: 1275-1281 (1989)) としても発表されている。W093/17706 には、動物にウイルスに対するワクチン摂取する方法として、担体粒子を遺伝子構築物で被覆し、被覆した粒子を動物の細胞内に投与する方法が記載されている。ヘルペスウイルスに対する DNA 免疫化(Cox et al., J.Virol. 67: 5664-5667 (1993))等が報告されている。また、DNA ワクチン、並びに、その製造法及び投与法等のについては米国特許第 4,945,050 号、第 5,036,006 号、第 5,589,466 号、及び、W094/16737 等にも記載されている。

#### 発明の開示

本発明の目的は、腫瘍に対するより有効な免疫療法を提供することであり、早期癌の根治療法、術後の癌の再発または転移の抑制療法、及び、腫瘍が発見されながらも手術が不可能で放射線及び化学療法も有効でない患者に対する治療法を

提供することである。

本発明は、腫瘍特異免疫を発現させるためのワクチンに関するものであり、CD4<sup>+</sup>ヘルパーT細胞により認識される抗原、及び、CD8<sup>+</sup>CTLにより認識される抗原をコードする発現ベクターをポリヌクレオチドワクチンとして用いることにより腫瘍特異免疫を誘導することができるという発見に基づくものである。従って、本発明はCD4<sup>+</sup>ヘルパーT細胞より認識される抗原、及び、CD8<sup>+</sup>CTLにより認識される抗原をコードする発現ベクターを含む組成物に関する。より詳細には、CD4<sup>+</sup>ヘルパーT細胞により認識される抗原は好ましくはSEREX法により見つけれられた分子であり、CD8<sup>+</sup>CTLにより認識される抗原は好ましくは腫瘍抗原である。また、これに限定されるわけではないが、CD4<sup>+</sup>ヘルパーT細胞及びCD8<sup>+</sup>CTLにより認識される抗原は好ましくは同じ細胞で発現され、提示されることを可能とするように同一の担体粒子上に固定され、細胞内へ投与されるものである。

本明細書中に記載の「CD4<sup>+</sup>ヘルパーT細胞により認識される抗原」とは、成熟したヘルパーT細胞、及び、その前駆体細胞上に発現する糖タンパク質CD4のエピトープとなる部分を含むポリペプチドを指す。T細胞受容体がMHCクラスIIにより提示された抗原を認識する際に、CD4はMHCクラスIIのβ2ドメインに結合し、T細胞の抗原認識能を高め、細胞内にシグナル伝達し、増殖やサイトカインの分泌を促進する働きを持つ分子である。本発明では、CD4<sup>+</sup>ヘルパーT細胞に認識される分子のうち特にSEREX法により同定される分子である。これらに限定されるわけではないが、熱ショックタンパク質であるDna J-like 2、DNAリガーゼ1、ガレクチン1及び、poly(A)結合タンパク質、*Homo sapiens* ヘキサメチレン-ビス-アストアミド誘導性(XM\_008348)、ヒトレチノイン酸応答性蛋白質(retinoic acid-responsive protein)(U50383)、*H. sapiens* 肝炎デルタ抗原反応蛋白質A(hepatitis delta antigen interacting protein A; DIPA)(XM\_006503)、*H. sapiens* cDNA FLJ20644 fis クローン KAT02588 (FLJ20644fis) (AK000651)等を挙げることができる。本明細書中の「SEREX 同定分子」とは、SEREX 法により同

定されたこれらの分子を意味する。また、本明細書中の「免疫原性野生型細胞性分子」とは、上述のような特に SEREX 法で同定された CD4<sup>+</sup>ヘルパーT細胞に認識される分子を指す。

また、本明細書中の「CD8<sup>+</sup>細胞障害性T細胞(CTL)により認識される抗原」とは、CTLとその前駆体細胞の細胞膜状に発現する膜貫通型の糖蛋白質CD8のエピトープとなる部分を含むポリペプチドを指す。T細胞受容体はMHCクラスIによって提示された抗原を認識する際に、MHCクラスIの $\alpha 3$ ドメインに結合し、それによりT細胞の抗原認識能が高められ、細胞内にシグナルが伝達される。本明細書中の「CD8<sup>+</sup>細胞障害性T細胞(CTL)により認識される抗原」は、このような経路によるT細胞の増殖や細胞障害性活性を促進する働きを持つ分子である。特に好ましくは、腫瘍抗原を指し、腫瘍に関連した抗原、及び、特定の腫瘍細胞に特異的に発現している抗原を指す。これらに限定されるわけではないが、例えば、変異MAPキナーゼであるERK2(mERK2)、HER2およびDna J-like 2等のポリペプチドを挙げることができる。特にHER2は、ヒトHER2 cDNA(c-erbB-2/HER2/neu cDNA)によりトランスフェクトされ生じるCMS5a由来のセルラインである先天性肉腫CMS17HER2の腫瘍拒絶抗原であり(Y.Nagata et al., J.Immunol. 159: 1336-1343 (1997); X.Gu et al., Cancer Res. 58: 3385-3390 (1998); Y.Ikuta et al., Int.J.Cancer 87: 553-558 (2000); T.Okugawa et al., Eur.J.Immunol. 30: 3338-3346 (2000))、本発明におけるCD8<sup>+</sup>細胞障害性T細胞(CTL)により認識される抗原として好ましい。ここで、HER2はその全長を利用しても良いし、免疫原性を示す断片であってもよい。CMS17HER2に対する腫瘍拒絶抗原、また、CD8<sup>+</sup> K<sup>d</sup>限定細胞毒性T細胞の標的として9merのペプチドHER2 p63-71(T)ペプチド(アミノ酸配列“TYLPTNASL”)が同定されている(Y.Nagata et al., J.Immunol. 159: 1336-1343 (1997); X.Gu et al., Cancer Res. 58: 3385-3390 (1998); Y.Ikuta et al., Int..J.Cancer 87: 553-558 (2000); T.Okugawa et al., Eur.J.Immunol. 30: 3338-3346 (2000))。このような抗原性部位を含む断片が

特に好ましい。また、HER2 と Dna J-like 2 との組み合わせは、本発明における CD8<sup>+</sup>細胞障害性 T 細胞(CTL)により認識される抗原として特に好ましい。

本発明において抗原をコードするポリヌクレオチドは、本発明の方法により宿主動物に投与することにより所望の免疫応答を生じさせ得る限り、特に限定されるものではなく、DNA または RNA 等であり得る。本発明の抗原をコードするポリヌクレオチドは、該ポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドが所望の免疫応答を宿主において生じさせることができる限り、そのヌクレオチド配列が配列部位特異的変異誘発法等の公知の手法により (edit. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (1987) John Wiley & Sons, Section 8.1-8.5 参照) 人工的に 1 以上のアミノ酸配列を欠失・置換・挿入・付加されたものでもよい。また、所望の免疫応答を宿主動物において生じさせ得る限り、自然界に存在する変異を有したポリペプチドをコードするものであっても良い。このような天然に存在する変異体は、公知のハイブリダイゼーション技術 (edit. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (1987) John Wiley & Sons, Section 6.3-6.4 参照)、及び、遺伝子増幅技術 (PCR) (edit. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (1987) John Wiley & Sons, Section 6.1-6.4 参照)を利用して単離することもできる。

また、抗原蛋白質をコードする遺伝子が知られている場合に、その蛋白質のアミノ酸配列上の疎水性／親水性領域を解析し (Kyte and Doolittle, J.Mol.Biol. 157: 105-122 (1982))、二次構造を解析し (Chou and Fasman, Ann.Rev.Biochem. 47: 251-276 (1978)) アミノ酸配列中の抗原性領域を推定すること (例えば、Anal.Biochem. 151: 540-546 (1985)参照)、そして、推定されたアミノ酸配列のペプチドを合成しその抗原性を PEPESCAN 法 (Nature 314 (1985); 特表昭 60-500684 号公報) 等により決定することは当業者が容易に行い得ることである。従って、前記方法に基づき決定されたエピトープ部分を含むペプチド断片をコードするポリヌクレオチドを化学合成等の手法により製造して本発明の抗原の発現ベ

クターとして用いることもできる。

本発明において用いられる発現ベクターは、本発明の抗原遺伝子を組込んだ組換えベクターであり、抗原遺伝子を挿入するベクターとしてはプラスミド、ファージ、コスミド、ウイルス、及び、当分野において従来用いられるその他のベクターを例示することができる。当業者であれば、例えば、edit. Sambrook et al., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y.)、及び、上述の Ausubel らにより編集された文献に記載の技術により様々なプラスミド及びベクターを構築することが可能である。

ここで用いるプロモーター、ターミネーター等の宿主内における発現制御を行う因子は、当業者であれば宿主の種類及び目的に応じて公知の制御配列から適宜選択し、抗原遺伝子の上流及び／または下流に配置することが可能である。従って、抗原由来の制御配列を用いてもよいし、異種の制御配列を用いることも可能である。また必要であれば、抗生物質耐性マーカー等のマーカーを本発明の発現ベクター中で用いることも可能である。多数の市販のベクターを利用することができるが、本発明において必須ではないポリヌクレオチド配列を除去することが好ましい。また、本発明で用いる CD4<sup>+</sup>ヘルパーT 細胞により認識される抗原をコードするポリヌクレオチド、及び、CD8<sup>+</sup>CTL により認識される抗原をコードするポリヌクレオチドは、同一細胞内で発現されるよう調節されている限り、各々異なる発現ベクターに含まれていても、1つの発現ベクターから発現されるように構成されていてもよい。

本発明のワクチンは、動物組織内への導入により、本発明の抗原の *in vivo* 発現を誘導し、所望の免疫応答を誘起するものである。核酸を生体内へ導入する種々の方法が知られており (T.Friedman, Science 244: 1275-1281 (1989))、本発明の抗原の *in vivo* 発現を誘導し、所望の免疫応答を誘起するものである限り、どのような導入方法を採用することもできる。

本発明の組成物はワクチンとして有用であり、naked プラスミドとして使用で

き、リボソーム内にパッケージングするか、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、アデノウイルス関連ベクター及びHVJベクター等の各種ウイルスベクターとして形成するか（例えば、K.Adolph “ウイルスゲノム法” CRC Press, Florida (1996) 参照）、または、コロイド金粒子等のビーズ（担体）に被覆して用いることができる。これに限定されるわけではないが、好ましくは遺伝子銃等により生体内に導入される金粒子等の担体粒子上に、CD4<sup>+</sup>ヘルパーT細胞により認識される抗原及びCD8<sup>+</sup>CTLにより認識される抗原を発現させるベクターを付着させた形態のものである。ポリヌクレオチドで担体粒子をコートする技術は公知である（例えば、W093/17706 参照）。最終的にポリヌクレオチドは、生体への投与に適する生理的食塩水等の溶液中に調製することができる。また、免疫応答を増幅するために当分野において公知の蛋白質、または、他の担体等のアジュバントと一緒に本発明の組成物を用いてワクチンとしてもよい。その他、プラスミドの細胞内取り込みの助けとなるカルシウムイオン等の薬剤を併用することも可能である。その他、必要に応じトランスフェクションを容易にする医薬的に許容される薬剤を併せて用いることができる。

本発明のポリヌクレオチドワクチンは、投与された宿主動物中で免疫応答を引き起こす方法であれば、いかなる方法により投与してもよい。好ましくは、本発明の組成物は適当な非経口経路、例えば、静脈内、腹腔内、皮下、皮内、脂肪組織内、乳腺組織内、吸入または筋肉内の経路を介して注射、注入、または、ガス誘導性粒子衝撃法（電子銃等による）、点鼻薬等の形態での粘膜経路を介する方法等により宿主動物内において免疫応答を引き起こすのに十分な量で投与される。また、本組成物を *ex vivo* でリボソームトランスフェクション、粒子衝撃法、または、ウイルス感染等を利用して血液細胞、及び、骨髓由来細胞（APC 等）等に投与して、該細胞を動物に再導入することにより宿主動物を免疫化してもよい。前述の投与方法のうち、加速粒子による遺伝子形質転換技術は米国特許第 4,945,



050 号にも記載されており、その改良法に基づく装置も市販されている(Biorad Laboratories)。

本発明の宿主動物の種類は、本発明の組成物により腫瘍免疫応答が増強される限り特に限定されるものではないが、特に、マウス、ラット、ウシ、ブタ、並びに、サル及びヒト等の霊長類を含む哺乳動物が挙げられる。特に霊長類、中でもヒトが本発明の好ましい宿主動物である。

本発明の組成物の投与量は組成物中の成分の宿主における免疫原性に依存するが、一定量の組成物を試験動物に投与し、ELISA 等の検定法により抗体力価を測定するか、クロム放出測定法等により CTL 応答を検出するか、または、サイトカイン放出測定法を使用して Th 応答を検出して、免疫応答を観察することにより当業者であれば免疫化に必要な適当な量を決定することができる。組成物中の成分の免疫原性が、本発明の発現ベクターで用いる転写及び翻訳プロモーター等の制御配列の強さにも依存するものであることが当業者には理解される。そして当業者であれば、使用する発現ベクターの種類に応じ本発明の組成物の投与量を調節することも容易に行い得る。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、mERK2 及び SEREX 同定分子を用いた免疫化により生じる 9m ペプチド特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞数の増加を示すグラフである。a. マウス SEREX 同定分子を免疫化に用いた場合の結果を示す。b. ヒト SEREX 同定分子を用いた場合の結果を示す。

図 2 は、SEREX 同定分子により誘導される 9m 特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞を増幅するのに 9m ペプチドと一緒に提示されることが必要であること(パネル a)、及び、CD4<sup>+</sup>T 細胞が必要であること(パネル b)を示すグラフである。

図 3 は、SEREX 同定抗原分子を認識する CD4<sup>+</sup>T 細胞によるヘルパー活性が一次、及び、二次応答の両方における 9m 特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞を増幅させることを示すグ

ラフである。

図4は、HER2 p63 ペプチドと共提示された SEREX 同定分子を認識する CD4<sup>+</sup>T 細胞が HER2 p63 特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞を増幅することを示すグラフである。

図5は、mERK2 または 147HER2、及び Dna J-like 2 を用いた免疫化による肺転移に対する *in vivo* の予防的、及び、治療的効果を示すグラフである。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明をより詳細に説明するが、該実施例は本発明をいかなる意味でも限定することを意図したものではない。

#### [実施例1] 腫瘍由来免疫原性分子の同定

マウス腫瘍細胞中の免疫原性分子を同定するために、BALB/c 起源の 3-メチルコラトレン誘導肉腫 CMS5、CMS2、CMS8 及び CMS13 ライン(A.B.DeLeo et al., J. Exp.Med. 146: 720-734 (1977))、並びに、CMS5 からサブクローン化した CMS5a 及び CMS5m から調製した cDNA の入ファージライブラリーを、同種の腫瘍ラインのマウス由来の血清試料(IgG 抗体)を用いて SEREX 法 (U.Sahin et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 92: 11810-11813 (1995)) によりスクリーニングした。検出された多数の遺伝子のうち、最も頻繁に検出された4つの遺伝子は、マウス熱ショック蛋白質である Dna J-like 2(AF055664)、マウスガレクチン-8(以下、galectin-8 と記載する)(AF218069)、マウス DNA リガーゼ 1(U19604)、及び、マウス polyA 結合蛋白質サイトプラズミック 1(以下、poly(A)と記載する)(X65553)であった。これらの遺伝子のコード配列を分析したところ、GenBank に登録されている配列と比べて変異している塩基は見られなかった(表1)。そして、これら4つの遺伝子を高度免疫原性腫瘍抗原の遺伝子として続いての試験に使用した。さらに、繰り返し行った SEREX スクリーニングで常にネガティブであった3つの cDNA、マウス分泌ネクシン 1(AB019214)、マウスグルコース制御蛋白質(glucose-r

egulated protein)(D78645)、及びシャペロン含有 TCP-1-zeta-1 サブユニットの Mus Cctz-1 遺伝子(AB022159)を腫瘍細胞由来の非免疫原性分子として以後の試験に使用した。

また、UT-7/TP0(ヒト巨核芽球白血病セルライン)(N.Komatsu et al., Blood 87: 4552-4560 (1996))の抗原をコードする cDNA を用い、特発性血小板減少性紫斑病患者からの血清により検出した。続いての研究のため、SEREX 同定ヒト遺伝子として 1) *Homo sapiens* ヘキサメチレン-ビス-アストアミド誘導性(XM\_008348)、2) ヒトレチノイン酸応答性蛋白質(retinoic acid-responsive protein)(U50383)、3) *H. sapiens* 肝炎デルタ抗原反応蛋白質 A(hepatitis delta antigen interacting protein A; DIPA)(XM\_006503)、及び 4) *H. sapiens* cDNA FLJ20644 fis クローン KAT02588 (FLJ20644fis) (AK000651)を選択した。

- 17 -

表 1

抗原 (アクセッション番号)	大きさ (bp)	起源 (cDNA 発現ライブラリー)
<b>マウス分子</b>		
<b>免疫原性*</b>		
熱ショック蛋白質 Dna J-like 2 (AF055664)	2,242	CMS5a 及び CMS2
DNA リガーゼ 1 (U19604)	3,172	CMS13
ガレクチン-8	1,086	CMS2 及び CMS7
poly(A)結合蛋白質サイトプラズミック 1 (X65553)	2,244	CMS8
<b>非免疫原性**</b>		
分泌ネクシン 1 (AB019214)	2,007	CMS5a
グルコース制御蛋白質 (D78645)	2,408	CMS5a
シャペロン含有 TCP-1-zeta-1 サブユニ ットの Cctz-1 遺伝子 (AB022159)	19,505	CMS5a
<b>ヒト分子</b>		
<b>免疫原性***</b>		
<i>Homo sapiens</i> HMBA 誘導 (XM_008348)	3,594	UT-7/TP0
ヒトレチノイン酸応答蛋白質 (U50383)	2,520	UT-7/TP0
<i>H. sapiens</i> 肝炎デルタ抗原反応蛋白質 A (XM_006503)	997	UT-7/TP0
<i>H. sapiens</i> cDNA FLJ20644 fis, クロー ン KAT02588 (AK000651)	1,781	UT-7/TP0

HMBA;ヘキサメチレン-ビス-アセトアミド

\*対応する腫瘍の cDNA 発現ライブラリーの腫瘍を有するマウスからの同系抗体を用いた SEREX 分析により検出。

\*\*CMS5a cDNA 発現ライブラリーからのクローンのランダムな選択により取得。

\*\*\*ヒト巨核芽球白血病セルラインの cDNA 発現ライブラリーの特発性血小板減少性紫斑病の患者からの抗体を用いた SEREX 分析により検出。

[実施例 2] SEREX 同定免疫原性野生型細胞分子による腫瘍特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞産生の増幅

mERK2 の全蛋白質をコードする cDNA を *EcoR* I 及び *BamH* I で消化し、pCAGGS-New(H.Niwa et al., Gene 106: 193-200 (1991)) の *EcoR* I 及び *Bgl* II サイトへクローニングした。該 mERK2 プラスミドを DH5  $\alpha$  (TOYOBO, Osaka, Japan) 中に維持し、QIAGEN Endfree Mega キット(QIAGEN, Hilden, Germany) で精製した。1) 該 mERK2 プラスミド単独、2) 該 mERK2 プラスミド、及び、マウス SEREX 同定分子である Dna J-like 2、DNA リガーゼ 1、ガレクチン-8 若しくは poly(A)、またはヒト SEREX 同定分子であるヘキサメチレン-ビス-アセトアミド(HMBA)誘導性、レンチノイン酸応答蛋白質、デルタ抗原反応蛋白質 A(DIPA) 若しくは FLJ20644fis をコードするプラスミドとの混合物、3) 該 mERK2 プラスミド及び SEREX 法でネガティブであった分子(分泌ネクシン、グルコース制御蛋白質、または Cctz-1) をコードするプラスミドの混合物、または 4) 該 mERK2 プラスミド及びニワトリ卵アルブミンをコードするプラスミドの混合物 1  $\mu$ g を、0.5mg の 1  $\mu$ m の金粒子(Bio Rad, Hercules, CA) と混合し、適量の 0.05M スペルミジン(Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を含む 1.5ml の遠心チューブに添加してプラスミド DNA を金粒子に付着させた(C.Condon et al., Nat.Med. 2: 1122-1128 (1997); A.Porgador et al., J.Exp.Med. 188: 1075-1082 (1998); D.Klinman et al., J.Immunol. 160: 2388-2392 (1998); C.A.T.Torres et al., J.Immunol. 158: 4529-4532 (1997); A.Iwasaki et al., J.Immunol. 159: 11-14 (1997) 参照)。7~9 週齢の BALB/c マウスの免疫化は、Hello Gene Gun System (BioRad, Hercules, CA) をヘリウム放出圧 350~400psi で用い、プラスミドでコートした金粒子を腹腔へ投与して行った。最初の免疫化から 2 週間の期間をおいて再度免疫化した。2 回目の免疫から 1 週間後に、マウスの脾臓より CD8<sup>+</sup>T 細胞を精製した。

次に、3-メチルコラトレン誘導マウス肉腫 CMS5 に特異的な抗原ペプチドとして同定され、CMS5 肉腫の腫瘍拒絶抗原であることが示唆された mERK2 由来の 9mer のペプチド 9m(アミノ酸配列"QYIHSANVL"; H.Ikeda et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 94: 6375-6379 (1997) 参照) の製造を宝酒造(Otsu, Japan) に依頼し、入

手した。また、コントロールとして、CMS17HER2 に対する腫瘍拒絶抗原、また、 $CD8^+ K^d$  限定細胞毒性 T 細胞の標的として同定された 9mer のペプチド HER2 p63-71(T) ペプチド(アミノ酸配列 “TYLPTNASL” ; Y.Nagata et al., J.Immunol. 159: 1336-1343 (1997); X.Gu et al., Cancer Res. 58: 3385-3390 (1998); Y.Ikuta et al., Int..J.Cancer 87: 553-558 (2000); T.Okugawa et al., Eur.J.Immunol. 30: 3338-3346 (2000)参照; 9m と同様に製造は宝酒造に依頼)(以下、p63 と記載する)を用いることにより、酵素結合イムノスポット分析の特異性を確認した。

該 9m ペプチドを DBA/2 起源の肥満細胞種セルラインである P1.HTR (A.Van Pel et al., Somatic Cell.Genet. 11: 467-475 (1985)) に適用した。

上述の免疫化したマウスの脾臓より入手した  $CD8^+T$  細胞について、9m ペプチドまたは p63-71(T)で刺激した P1.HTR 細胞を用い  $IFN\gamma$  を分泌する細胞を ELISPOT 検定法により測定し、9m ペプチドに対して特異的な  $CD8^+$ 細胞の存在を定量的に分析した。

ELISPOT 検定は、Power らの方法(J.Immunol.Methods 227: 99-107 (1999))を改変して、次のように行った。96 ウェルニトロセルロースコートマイクロタイタープレート(Millipore, Bedford, MA)にラット抗マウス  $IFN\gamma$  抗体(クローン R4-6A2, Pharmingen, SanDiego, CA)を  $4^\circ C$ で一晩インキュベートし、洗浄した後、1~2 時間  $37^\circ C$ でブロックした。 $1 \times 10^6$  の  $CD8^+T$  細胞、及び、 $1 \times 10^5$  の P1.HTR を各ウェルに添加し、 $37^\circ C$ で 24 時間インキュベートした。その後、ウェルをよく洗浄し、ビオチン化抗マウス  $IFN\gamma$  抗体(クローン XM G1.2, Pharmingen, SanDiego, CA)を添加し、 $4^\circ C$ で一晩インキュベートした。洗浄後、アルカリホスファターゼ結合ストレプトアビジン(MABTECH, Nacka, Sweden)を添加し、室温で 1.5 時間インキュベートした。アルカリホスファターゼ結合基質キット (BioRad, Hercules, CA) の添加によりスポットを形成させた。プレートをよく洗浄し、乾燥した。解剖顕微鏡、及び、Axloplan2 imaging system (Carl Zeiss vision, Hailb

ergmoss, Germany) を用い、形成されたスポット数をカウントした。

その結果、mERK2 cDNA のみで免疫化したマウスは、低レベルで 9m ペプチド特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞を産生した(図 1)。それに対して、mERK2 及び SEREX 同定抗原で免疫化したマウスでは、9m ペプチド特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞の顕著な増加が観察された(図 1a)。これらのマウスにおける陽性のスポットは、mERK2 cDNA のみで免疫化されたマウスと比べ 3~10 倍であった。対照的に、mERK2 プラスミド、及び、繰り返し行われた SEREX 分析で検出されなかった分子、例えば、分泌ネクシン、グルコース制御蛋白質、または Cctz-1 をコードするプラスミドで免疫化されたマウスでは、9m ペプチド特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞の増加は見られなかった(図 1a)。コントロールベクターとの共免疫化により 9m ペプチド特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞の増加は見られなかった(図 2a)。p63 を適用した標的細胞に対するスポット数は非常に少なく、本 ELISPOT 検定法の特異性が確認された。

ヒト SEREX 同定免疫原性異種分子をコードする cDNA もまた、mERK2 と共に提示された場合に、9m ペプチド特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞応答を増加させた(図 1b)。対照的に、ニワトリ卵アルブミンによる共免疫化はペプチド特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞反応性をわずかしき増加しなかった(図 1c)。

ここで、図 1 のグラフ中の各棒は 10<sup>5</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞当たり IFN $\gamma$  分泌 CD8<sup>+</sup>T 細胞の数を表す。標的細胞は 9m により刺激された P1.HTR(斜線の入った棒)、またはコントロールとして p63 により刺激された P1.HTR(黒棒)であった。データは 3 連実験の平均 $\pm$ SEM として表される。

### [実施例 3] SEREX 同定分子及び CD8<sup>+</sup>T 細胞エпитープの共提示が CD8<sup>+</sup>T 細胞応答の増幅に必要なかの確認

CD8<sup>+</sup>T 細胞エпитープと SEREX 同定分子が同じ金粒子上に提示されている必要があるかどうかを決定するために、以下 1) または 2) のいずれかの方法によりマウスを免疫化した：

1)mERK2 プラスミドのみでコートされた金粒子及び Dna J-like 2 プラスミドのみでコートされた金粒子の混合物を用いて免疫化(別々にコート)

2)mERK2 プラスミドのみでコートした粒子、及び Dna J-like 2 プラスミドのみでコートした粒子をマウスの腹部のそれぞれ異なる側に注射(別部位)

プラスミドでコートされた金粒子の製造、及び免疫化は実施例 2 記載の方法と同様に行い、また標的細胞も同じものを用いた。続いて、9m ペプチド特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞数を調べた。

CD4<sup>+</sup>T 細胞により認識される抗原をコードするプラスミド、及び、CD8<sup>+</sup>T 細胞により認識される抗原をコードするプラスミドの両方で一緒にコートされた粒子で免疫された動物でのみ、9m 特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞数の増幅が観察された。9m ペプチドに特異的な CD8<sup>+</sup>T 細胞の増加は、上記 1)、及び 2)のどちらのグループでも観察されなかった(図 2a)。CD4<sup>+</sup>T 細胞は mERK2 由来の 9mT 細胞エピトープを提示する細胞により提示される SEREX 同定抗原ペプチドを認識することが確認された。データは 3 連実験の平均±SEM として表される。

#### [実施例 4] CD8<sup>+</sup>T 細胞応答増幅の CD4<sup>+</sup>T 細胞依存性

次に、CD4<sup>+</sup>T 細胞が、SEREX 同定抗原による 9m ペプチド特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞の誘導の促進に関与しているかどうかを調べた。抗 CD4 抗体(GK1.5)、または、コントロールとして抗 Lyt2.1 抗体で BALB/c マウスを処理した。続いて、実施例 2 記載の方法に従って、前述の各抗体で処置したマウスを mERK2 プラスミド、及び、Dna J-like 2 プラスミドで免疫化した。標的細胞は実施例 2 と同じものを用いた。

マウスを mERK2 をコードするプラスミド及び SEREX 同定抗原 Dna J-like 2 をコードするプラスミドの混合物を用いた免疫化の前に予め抗 CD4 抗体(GK1.5)で処理した場合には、9m ペプチド特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞の増加は観察されなかった。それに対し、コントロール抗体(Lyt-2.1)ではそのような 9m ペプチド特異的 CD8



- 22 -

<sup>+</sup>T細胞増加の阻害は起こらなかった(図2b)。従って、mERK2 プラスミド及び Dna J-like 2 プラスミドを用いて免疫化することによる CD8<sup>+</sup>T細胞の増幅が CD4<sup>+</sup>T細胞に依存するものであることが示された。データは3連実験の平均±SEMとして表される。

[実施例5] 免疫原性ヘルパー野生型細胞性分子の CD8<sup>+</sup>T細胞の1次及び2次腫瘍特異的応答への関与

一次応答のモデルとしてナイーブマウス(図3a)、及び、二次応答のモデルとして mERK2 をコードするプラスミドで2回、前免疫化したマウス(図3b)を、実施例2記載の方法に従って、mERK2、または、mERK2 及び Dna J-like 2 をコードするプラスミドのどちらかで免疫化した。免疫化から14日後に 9m 特異的 CD8<sup>+</sup>T細胞について同じ方法により分析した。図3にその結果を示す。結果は3連実験の平均±SEMで表される。1次応答及び2次応答の両方のモデルにおいて、mERK2 及び Dna J-like 2 をコードするプラスミドで免疫化されたマウスでは 9m 特異的 CD8<sup>+</sup>T細胞数が明らかに mERK2 をコードするプラスミドのみで免疫化されたものと比べて増加していた。

[実施例6] 免疫原性野生型分子による HER2 特異的 CD8<sup>+</sup>T細胞誘導の増幅

ヒト HER2 のN末端の147個のアミノ酸残基をコードする cDNA プラスミド(以下、147HER2と記載する)を Dna J-like 2 若しくはリガーゼ1をコードするプラスミドと共に、または、これらの SEREX 同定分子無しで用い、実施例2記載の方法に従ってマウスを免疫化した。実施例2と同じ標的細胞を用い、IFN $\gamma$  分泌 CD8<sup>+</sup>T細胞数を同様に計測した。どちらの SEREX 同定分子で共免疫化された場合でも、HER2 p63 特異的 CD8<sup>+</sup>T細胞の増幅が観察された(図4a)。結果は3連実験の平均±SEMで表される。

実施例3の mERK2 の場合と同様に、1)147HER2 プラスミド及び SEREX 同定分子

プラスミドと一緒にコートした金粒子で免疫化したマウス、2)別々にコートした金粒子で免疫化したマウス、及び、3)別々にコートした粒子をそれぞれ腹部の離れた部位に投与したマウスにおける、HER2 p63 特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞の増幅を調べた (図 4b)。結果は 3 連実験の平均±SEM で表される。p63 特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞数の増幅は、2つの異なる分子のプラスミドと一緒にコートされた粒子で免疫化されたマウスでのみ観察された。

この結果を mERK2 標的腫瘍特異的免疫の実験結果と合わせて考慮すると、免疫原性野生型細胞性分子に対する免疫応答が種々の腫瘍系において抗腫瘍免疫応答における CD8<sup>+</sup>T 細胞の発生を促進させる作用を有することが強く示唆された。

#### [実施例 7] In vivo における腫瘍拒絶

CMS5m 腫瘍細胞は、*in vivo* 注射の後、肺転移を起こし、動物を 5~6 週間以内に死に到らしめる。そこで、総量 0.1ml の  $1 \times 10^6$  CMS5m 腫瘍細胞を側尾静脈より BALB/c マウスへ投与し、肺転移についてのモデルとした。1)mERK2 をコードするプラスミド、2)mERK2 プラスミド及びコントロールベクターをコードするプラスミドの混合物、3)mERK2 プラスミド及び Dna J-like 2 プラスミドの混合物、により腫瘍投与(challenge)の 14 日前、7 日前、腫瘍投与の日(同日)、または、腫瘍投与から 5 日後に実施例 2 記載の方法による隔週免疫化を開始した。腫瘍投与から 28 日後にマウスを殺し、肺小瘤数を解剖顕微鏡で数えた。各グループについて 5 匹の動物を用い、結果はその平均±SEM として表した。

腫瘍投与を始める 14 日前にマウスを mERK2 をコードするプラスミドで免疫化することにより肺転移を完全に予防することができた。この予防的な効果は、腫瘍投与の 7 日前に行った場合、または腫瘍投与後に行った場合には見られなかった (図 5a)。それに対して、mERK2 プラスミド及び Dna J-like 2 プラスミドを組合せての免疫化では、腫瘍投与から 5 日後までの免疫化でも転移が完全に予防された (図 5a)。転移の有無は組織病理学的試験により確認した。図中の数値は各グ

ループについて 5 匹のマウスの平均±SEM として表される。

次に、mERK2 プラスミド及び Dna J-like 2 プラスミドと一緒にコートした金粒子、並びに別々にコートした金粒子の混合物を用いた以外は、上述の方法と同様に、マウスを腫瘍投与から 5 日後に免疫化し、その治療的効果を調べた。mERK2 及び Dna J-like 2 による治療的な効果は別々にコートした粒子の混合物を用いた場合には肺転移は完全には抑制されず、これら 2 分子が同じ金粒子上に共提示されることが必要であることが示された(図 5b)。図中の数値は各グループについて 5 匹のマウスの平均±SEM として表される。

さらに、実施例 4 の方法に従いマウスを抗 CD4mAb(GK1.5)で処理し、上述の方法と同様に、mERK2 及び Dna J-like 2 で共コートした金粒子を用いて腫瘍投与から 5 日後に免疫化し、その治療的効果を調べた。その結果、抗 CD4mAb(GK1.5)処理により mERK2 及び Dna J-like 2 の治療的効果が失われた。mERK2 及び Dna J-like 2 の治療的効果が CD4<sup>+</sup>T 細胞依存的であることが示された(図 5c)。図中の数値は各グループについて 5 匹のマウスの平均±SEM として表される。

147HER2 をコードするプラスミド、及び 6)147HER2 プラスミド及び Dna J-like 2 プラスミドの混合物を用い、マウスを腫瘍投与から 5 日後に免疫化し、その治療的効果を調べた。マウスを腫瘍投与から 20 日後に殺した以外は、上述の方法に従って行った。その結果、CMS5mHE に対する同様に増幅された治療的効果が示された(図 5d)。図中の数値は各グループについて 5 匹のマウスの平均±SEM として表される。

以上のように、CD4<sup>+</sup>ヘルパーT 細胞により認識される抗原、及び、CD8<sup>+</sup>細胞障害性 T 細胞により認識される抗原をコードする発現ベクターを同一粒子上にコートして免疫化を行うことにより、T 細胞エпитープを単独で用いた場合の免疫化では達成することのできなかつた腫瘍の肺転移を完全に阻害することができた。

#### 産業上の利用の可能性

以上のように、本発明により  $CD4^+$ ヘルパーT 細胞の免疫原性野生型細胞性分子の  $CD8^+$ T 細胞による腫瘍特異的免疫応答を増幅する上での重要な役割が明らかにされた。マウスの腫瘍抗原に対する SEREX 同定抗原の共認識による高められた  $CD8^+$ T 細胞応答の現象は、ヒトにおいても同様な現象が存在することが考えられ、破壊された腫瘍細胞の複合的な抗原性混合物の APC による同時の取り込みの結果起こる。SEREX 抗原と腫瘍抗原の共免疫化によりマウスにおいて、腫瘍投与に対する耐性が高まる。これはヒトの癌免疫治療において、魅力的な手法であり、今後さらに SEREX 同定ヒト腫瘍抗原の情報が充実されれば、より容易な癌免疫治療の手法になると考えられる。

本発明の腫瘍特異免疫を発現させるためのワクチンにより、腫瘍に対するより有効な免疫療法を提供される。本発明のワクチンは予防的及び治療的な効果を示すものであり、これにより、早期癌の根治療法、術後の癌の再発または転移の抑制療法、及び、腫瘍が発見されながらも手術が不可能で放射線及び化学療法も有効でない患者に対しての治療を提供することが期待される。

## 請求の範囲

1. CD4<sup>+</sup>ヘルパーT細胞により認識される抗原、及び、CD8<sup>+</sup>細胞障害性T細胞により認識される抗原をコードする発現ベクターを含む組成物。
2. CD4<sup>+</sup>ヘルパーT細胞により認識される抗原が SEREX 法により同定される分子である、請求項 1 に記載の組成物。
3. CD8<sup>+</sup>細胞障害性 T 細胞により認識される抗原が腫瘍抗原である、請求項 1 または 2 に記載の組成物。
4. CD8<sup>+</sup>細胞障害性 T 細胞により認識される腫瘍抗原が HER2 である、請求項 3 に記載の組成物。
5. CD8<sup>+</sup>細胞障害性 T 細胞により認識される腫瘍抗原が HER2 および Dna J-like 2 である、請求項 3 または 4 に記載の組成物。
6. 両抗原をコードするポリヌクレオチドが各々、異なる発現ベクターに含まれる、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の組成物。
7. 両発現ベクターが同一の担体粒子上に固定された、請求項 6 に記載の組成物。
8. 請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の組成物を含むワクチン。
9. 遺伝子銃を用いて投与される、請求項 8 に記載のワクチン。
10. 癌の予防及び／または治療のための請求項 8 または 9 に記載のワクチン。
11. 請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の組成物を哺乳動物へ投与することを含む、哺乳動物において腫瘍特異的免疫を誘導する方法。

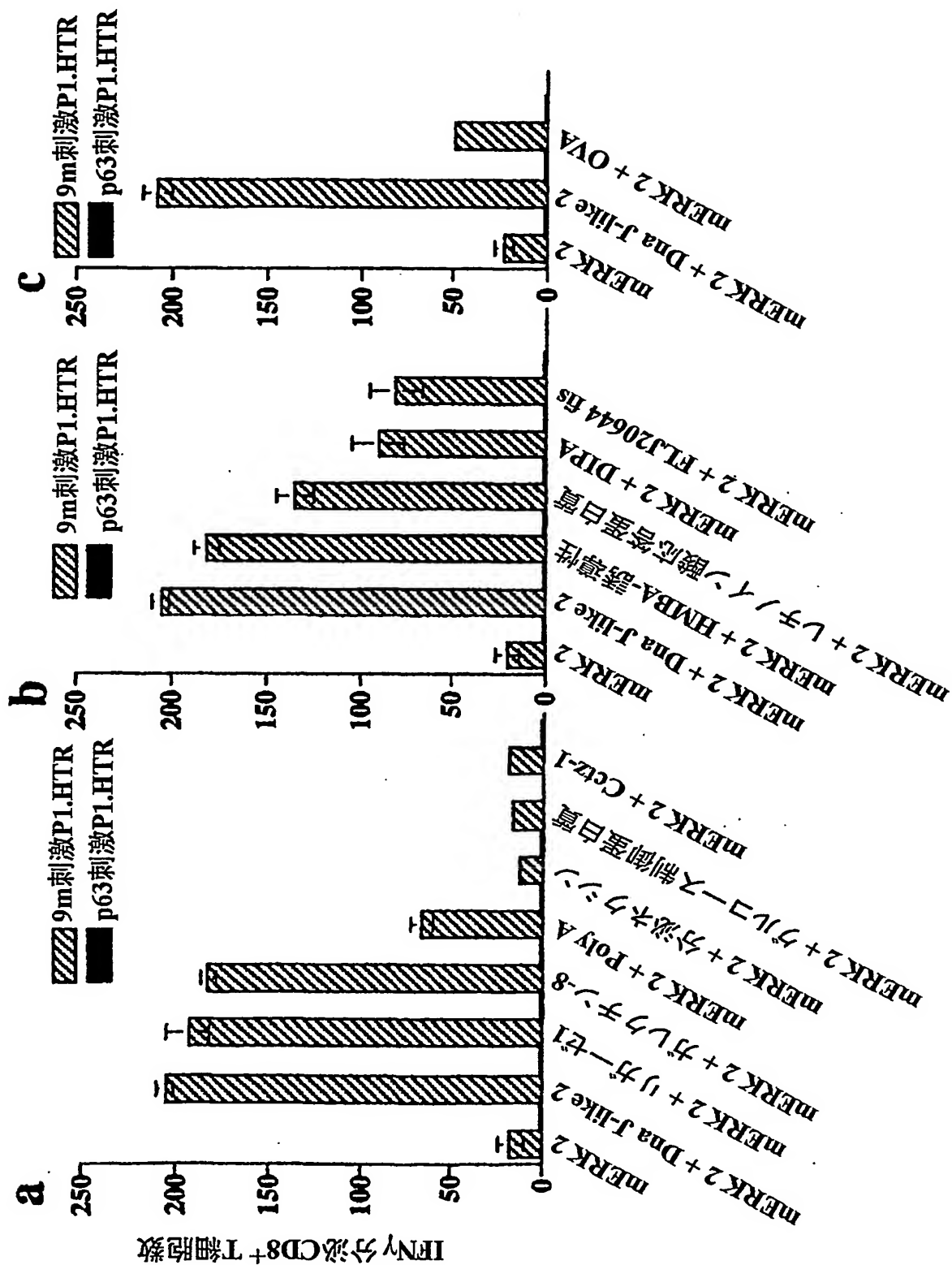
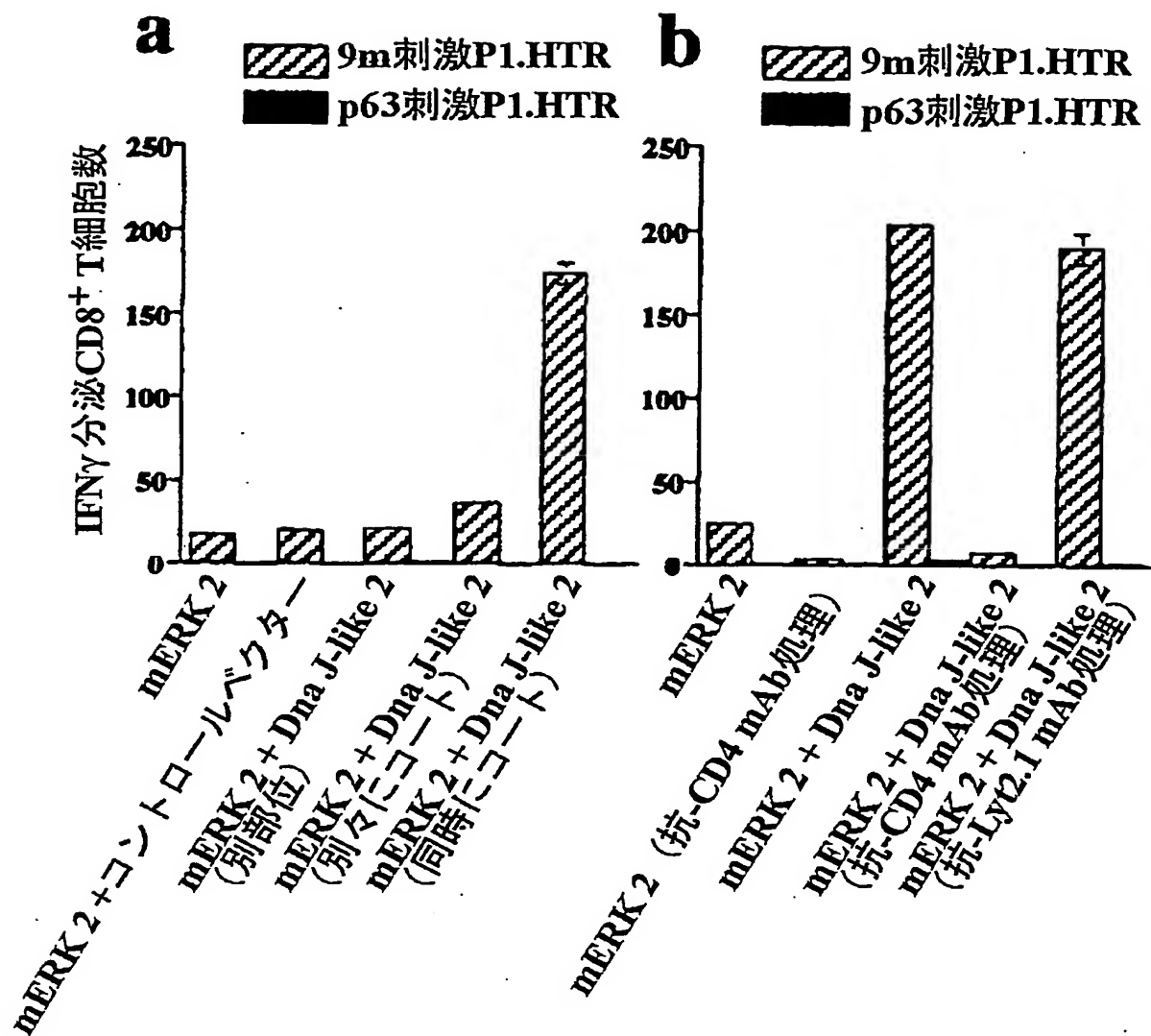
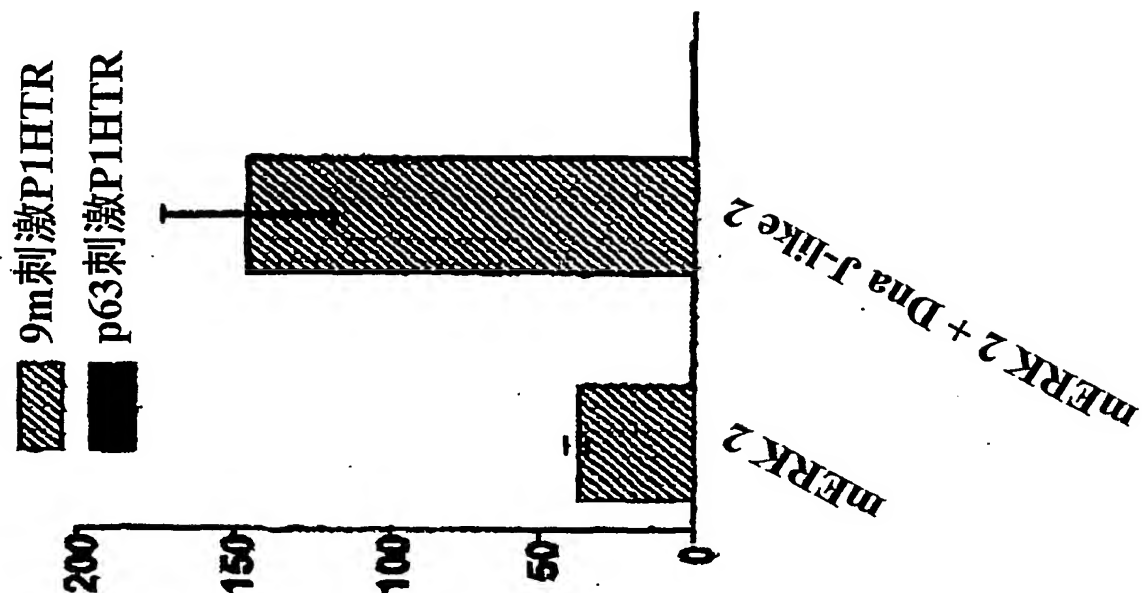


図 1

図 2



## b. mERK2により二度免疫化したマウス



## a. ナイーブマウス

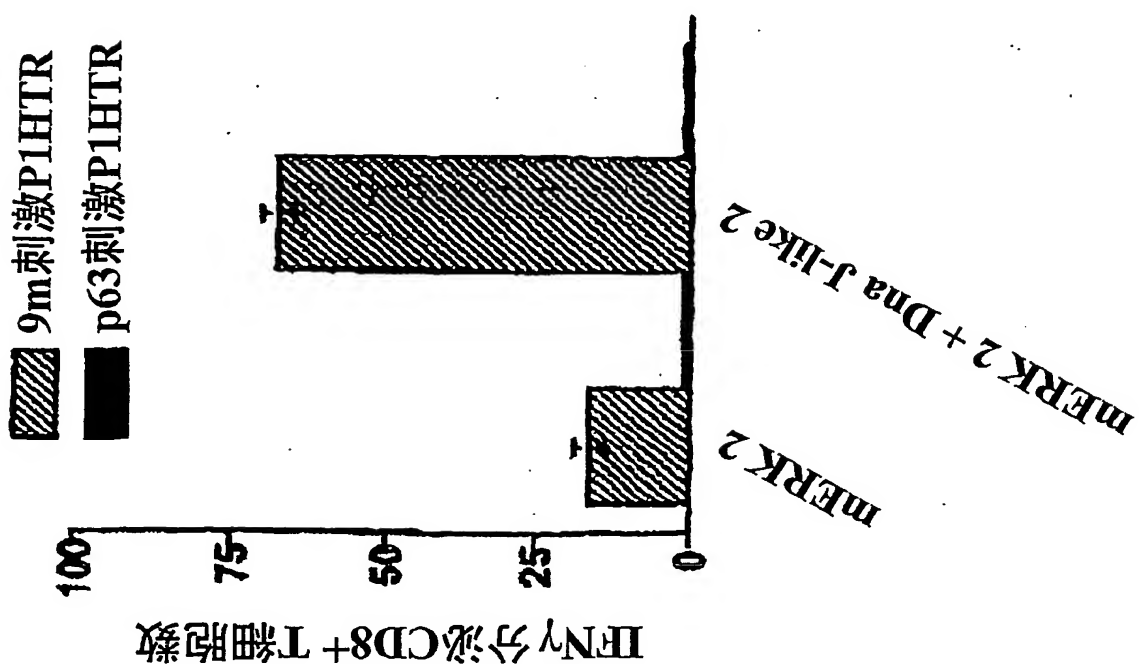
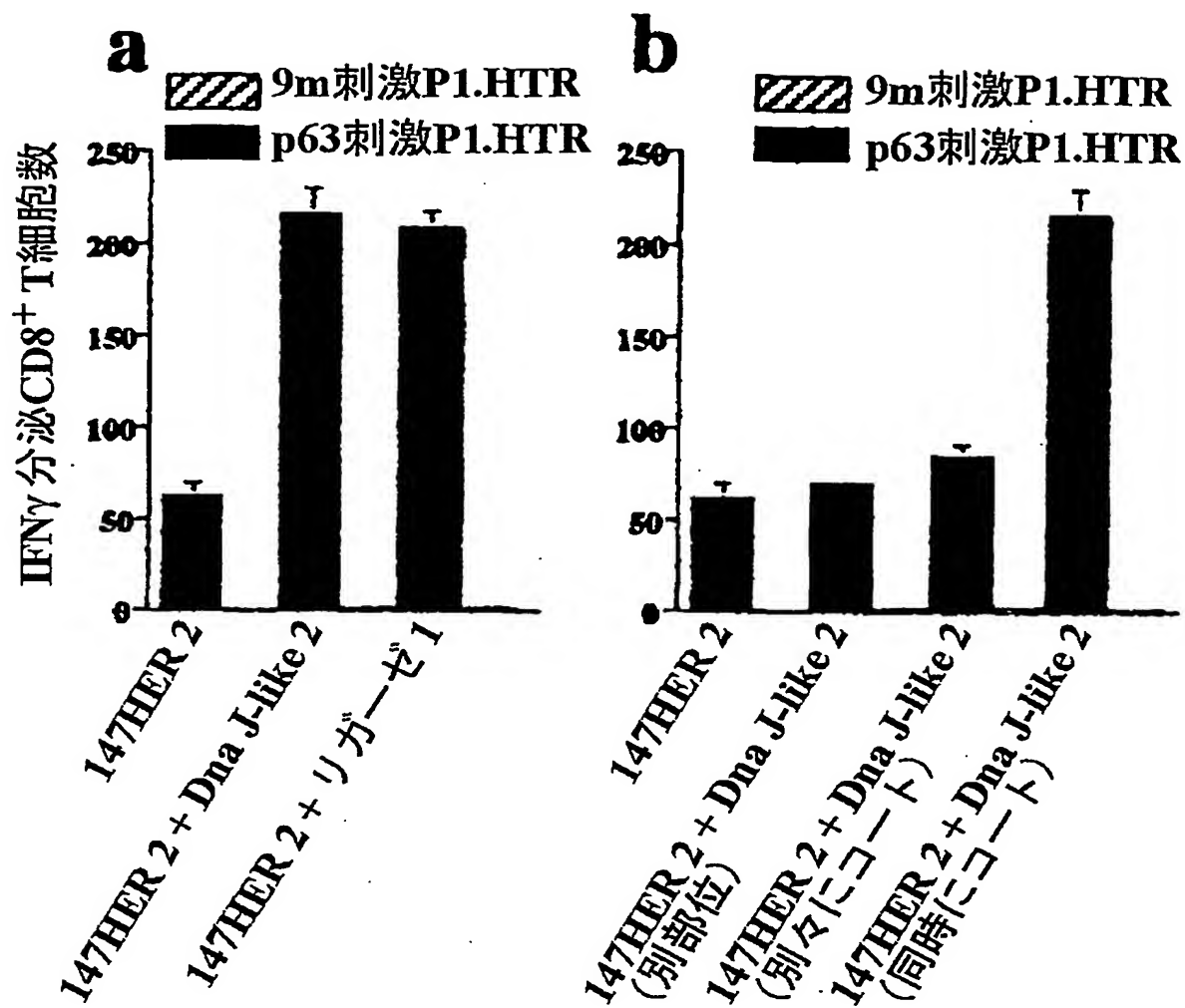


図3



図 4



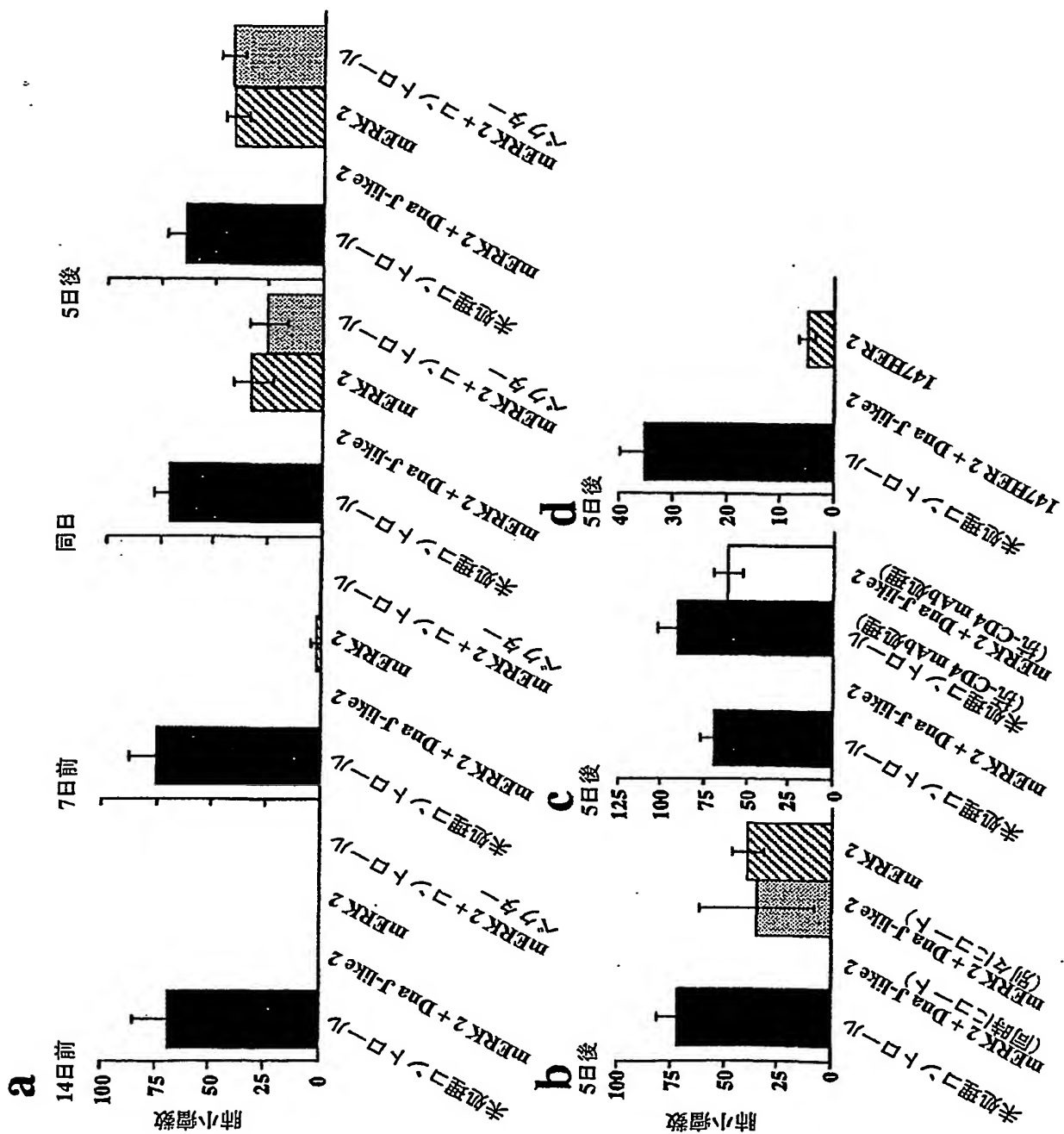


図 5

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

CT/JP02/05486

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/12, C12N15/11, A61K38/02, A61K39/00, A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/12, C12N15/11, A61K38/02, A61K39/00, A61K48/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
JICST (JOIS), CA/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	H. NISHIKAWA, H. SHIKU et al., Role of SEREX-defined immunogenic wild-type cellular molecules in the development of tumor-specific immunity., Proc.Natl. Acad.Sci. USA(2001 Dec.), Vol.98, No.25, pages 14571 to 14576	1-10
P,X	Hiroyoshi NISHIKAWA, Hiroshi SHIKU, "Shucho Men'eki Yudo DNA Vaccine", Clinical Immunology (2002 April), Vol.37, No.3, pages 328 to 333	1-10
X A	Hiroshi SHIKU, "Hito Gankogen no Dotei to Men'eki Ryoho no Atarashii Makuake", Overview, Gendai Iryo (2000), Vol.32, No.5, pages 24 to 30	<u>1-4, 6-10</u> 5
A	Hiroshi SHIKU, "Gan Peptide Vaccine Ryoho", The Tissue Culture (2000), Vol.26, No.1, pages 9 to 12	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
25 September, 2002 (25.09.02)

Date of mailing of the international search report  
08 October, 2002 (08.10.02)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP02/05486

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	H. IKEDA, H. SHIKU et al., Mutated mitogen-activated protein kinase: a tumor rejection antigen of mouse sarcoma., Proc.Natl.Acad.Sci.USA(1997), Vol.94, No.12, pages 6375 to 6379 .	1-10

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/05486

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 11

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 11 pertains to methods for treatment of the human body by therapy.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/12, C12N15/11, A61K38/02, A61K39/00, A61K48/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/12, C12N15/11, A61K38/02, A61K39/00, A61K48/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICST(JOIS), CA/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P X	H. NISHIKAWA, H. SHIKU, et. al., Role of SEREX-defined immunogenic wild-type cellular molecules in the development of tumor-specific immunity., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2001 Dec), Vol. 98, No. 25, p. 14571-14576	1-10
P X	西川博嘉, 珠玖 洋, 腫瘍免疫誘導DNAワクチン, 臨床免疫 (2002 April), Vol. 37, No. 3, p. 328-333	1-10
<u>X</u> A	珠玖 洋, ヒト癌抗原の同定と免疫療法の新しい幕開け オーバービュー, 現代医療 (2000), Vol. 32, No. 5, p. 24-30	<u>1-4, 6-10</u> 5

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25.09.02

国際調査報告の発送日

08.10.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 美葉子

4N

9839

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	珠玖 洋 , 癌ペプチドワクチン療法 , 組織培養 (2000) , Vol. 26, No. 1, p. 9-12	1 - 1 0
A	H. IKEDA, H. SHIKU, et. al. , Mutated mitogen-activated protein kinase: a tumor rejection antigen of mouse sarcoma. , Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1997) , Vol. 94, No. 12, p. 6375-6379	1 - 1 0

第 I 欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第 1 ページの 2 の続き)

法第 8 条第 3 項 (PCT 17 条 (2) (a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 11 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、  
請求の範囲 11 は、ヒトの身体の治療による処置方法に該当するものである。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

第 II 欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第 1 ページの 3 の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。